

# Frost Injury and Resistance in the Poplar Sawfly, *Trichiocampus populi okamoto* (ポプラハ バチの凍害と耐凍性)

著者	丹野 皓三
号	289
発行年	1970
URL	<a href="http://hdl.handle.net/10097/23574">http://hdl.handle.net/10097/23574</a>

氏名・（本籍）	たんのこうぞう 丹 野 皓 三
学位の種類	理 学 博 士
学位記番号	理 第 2 8 9 号
学位授与年月日	昭和 4 5 年 9 月 2 4 日
学位授与の要件	学位規則第 5 条第 2 項該当
最 終 学 歴	昭和 3 5 年 3 月 東北大学理学部生物学科卒業
学位論文題目	Frost Injury and Resistance in the Poplar Sawfly, <i>Trichiocampus populi okamoto</i> ( ポプラハバチの凍害と耐凍性 )
論文審査委員	(主査) 教授 青 木 廉 教授 加 藤 陸奥雄 教授 樋 渡 宏 一

## 論 文 目 次

Abstract	
I. Introduction	
II. Materials and Methods	
III. Results	
1) Seasonal change in frost resistance and sugar content in the insect	
2) Fat-body cells in the prepupa	
3) Freezing state of fat-body cells	
4) Intracellular freezing in fat-body cells in the prepupae frozen with various cooling rates and the post-thawing injury in whole insect	
5) Injury in frozen insects cooled to liquid nitrogen temperature	
6) Termination of prepupal diapause by body freezing	
Discussion	
Summary and Conclusion	
References	
Tables, Figures and Plates	

## 論文内容要旨

### I 緒 言

越冬昆虫の耐凍性と関連して、1957年以来多くの研究者により昆虫の体内に含まれるグリセリンの役割が論じられてきた。その結果、昆虫の体内にグリセリンが存在するということだけで凍害を防止する効果がある訳ではないが、ほとんどの耐凍性昆虫の体内にグリセリンが存在し、このグリセリンの存在が昆虫の耐凍性を高めるのに役立つことが確められている。ところでポプラハバチの越冬前蛹は凍結状態で $-196^{\circ}\text{C}$ まで温度をさげても生存することができるが、この昆虫の体内にグリセリン等の多価アルコールの存在は認められなかった。そのかわり、この前蛹の体内に多量の糖類が存在することがみいだされた。本論文はまずこの昆虫の一個体としての耐凍性の季節的变化に関連したいくつかの性質について述べる。

一般に緩慢凍結では非常に低い温度の凍結に耐えられる昆虫でも、これを人工的に急速に凍結すると凍害を受けやすくなる。本論文では急速凍結及び液体窒素温度での凍結により融解後にこの前蛹に現われる凍害についても実験を行ない、この様な人工的な凍結手段による凍害の機構について考察した。またこの前蛹を $-15^{\circ}\text{C}$ 以下に冷却し凍結すると休眠がただちに終了する事実を見いだしたので、凍結の昆虫一個体に対する影響という観点から併せて述べた。

### II 実験結果と解釈

#### 1) 耐凍性と糖含量の季節的変動

9月の上旬から中旬にかけて多数のポプラハバチの終齢幼虫がポプラの樹皮をつたっておりてくるのがみられる。採集したこの虫に乾燥したハンゴンソウの茎を与えると、虫は茎の中にすぐもぐりこみ繭を作りはじめる。そして三日後に繭を完成して前蛹になる。幼虫はいずれも非耐凍性であるが、繭を作り前蛹になると耐凍性は急速に高まり、40日後には液体窒素の温度まで耐えられるようになる。これと平行して体内の糖含量の増大がみられた。幼虫の糖含量は生体重あたり $17\text{mg/g}$ であるが、繭をつむいであら40日目の前蛹は $40\text{mg/g}$ であった。翌年の6月に前蛹の外観が棒状になり蛹の形態に近くなると耐凍性の低下と平行して糖含量は急速におちはじめ蛹では $12\text{mg/g}$ で、成虫では $5\text{mg/g}$ であった。一方グリコーゲンは幼虫の時期に $6\text{mg/g}$ ほどであったが、前蛹になってから40日目にはほとんどなくなった。急速な糖の増加をグリコーゲンだけでは量的に説明できない。これは糖含量を表わすのに生体重あたりで表現していることに原因がある。この時期に虫体の含水量の著しい減少があり、その結果、生体重の小さくなった前蛹ではこの表現での糖含量が大きくなる。グリコーゲンと糖量の和はその絶対量は蛹化が進みだすまでほとんど変化しなかった。6月の中旬に虫の外観が蛹の形態に近くなると耐凍性の低下と平行して糖量は急速におちはじめ、蛹では $12\text{mg/g}$ に減少した。このポプラハバチの耐凍性と糖含量との密接な平行関係から考えて、種類もまたグリセリンに於いて考えられているように、生物細胞を凍結のときの原形質からの脱水や細胞の内外における塩溶液の濃縮

から保護する作用を有するものと考えられる。越冬前蛹に含まれる糖類の主体はトレハロースであった。トレハロースが糖類のうちで占める割合は耐凍性と密接な平行関係を持っていた。耐凍性の高い前蛹の時期ではその割合は90%前後であるのに対して、耐凍性のない幼虫、蛹、成虫では20~68%であった。

## 2) 急速凍結による凍結障害と脂肪細胞

一般に生物細胞は急速凍結によって細胞内凍結を起こし致命的な障害を受けやすいことが知られている。しかるにある種の昆虫の脂肪細胞において、細胞内凍結が致命的でないとする報告があるので、ポプラハバチの前蛹を用いて毎分0.4℃から827℃までの冷却速度で凍結実験を行なった。その結果冷却速度がますにつれて、細胞内凍結を起こした脂肪細胞が増加する個体が得られた。脂肪細胞の大部分が細胞内凍結を起こした前蛹でも融解後に生存していたが蛹化できるものはひとつもなかった。細胞内凍結を起こした脂肪細胞が少なくなるにつれて融解後に現われる変態障害の程度は軽くなる傾向があった。この事実とポプラハバチの前蛹が成虫に変態する過程で脂肪細胞が重要な役割を演じてその大部分のものが消費される事実とを合わせて考えると、他の細胞の場合で知られている様に細胞内凍結は脂肪細胞においても致命的であると思われる。

## 3) — 196℃での凍結障害

越冬昆虫のいくつかの種類は冬の外気温よりもはるかに低い温度である液体窒素の中でも生存することができる。しかしこの様な低い温度で凍結した昆虫は融解後に成虫まで変態しても羽化のさいに自力で脱皮できないために翅がのびない場合が多い。昆虫を室温から直接液体窒素中にひたすと大部分の細胞が細胞内凍結を起こしてしまい虫は生存できない。虫をこの低い温度で生存させるために予備凍結法が用いられる。これは虫体をあらかじめ-30℃程度の温度で凍結させて細胞内の水分の大部分のものを細胞外に氷結させてから液体窒素中に投入する方法である。ポプラハバチの前蛹を-30℃で予備凍結してから液体窒素にひたすと、融解後に成虫まで変態するが、大部分のものが脱皮障害をおこす。ところが-30℃で予備凍結したものを-5℃まで温度をあげて18時間置き、それから再度-30℃まで冷却しその後液体窒素にひたすと、融解後に大部分のものは正常な成虫に変態できた。予備凍結の段階で-5℃に1度上げた前蛹を-20℃に再度下げてから凍結切片にして観察したところ、この虫体内の無数の氷晶は、-5℃に上げずに-20℃まで冷却した前蛹の体内の氷晶にくらべてはるかに大きくその氷晶の形はより丸みをおびていた。これらの結果から脱皮障害の機構を虫体内の氷晶の大きさと関連させて考察した。その結果、液体窒素の中に虫を入れた時に起きる虫体の熱収縮が第一の原因であろうと推論された。

熱収縮によって生じた虫体内のひずみが解消する時に生ずる力で脂肪細胞が機械的に破壊され、融解後に変態障害となって現われるものと思われる。

## 4) 凍結による休眠の終止

休眠中のポプラハバチの前蛹を-15℃以下の温度で凍結すると30分間で休眠が終止した。-15℃の凍結で使用頭数の25%の前蛹が休眠を終止し、-20、-25℃及び-30℃の温度での凍結は平均67%のものが休眠を終止した。-10℃以上の温度では21日間前蛹を凍結させても休眠を終止するものはなか

った。凍結により休眠を終止する虫の数は凍結温度だけに係し、凍結時間を30分から21日間まで延長しても休眠が終止する割合は変らなかつた。気温が0℃近くになる12月初旬に外気温から2℃に移して保存した前蛹は翌年の3月中旬まで休眠を保っていた。一方外気にさらしておいた前蛹は、気温が-18℃以下に低下した直後に大部分のものが休眠を終止した。深谷等によるニカメイガの実験によると、休眠期のアラタ体は細胞の中に多くの液胞を持ち組織学的に活性であり、アラタ体から分泌されるホルモンが脳や前胸腺の神経分泌の活性を阻害している。ポプラハバチ前蛹の休眠においても活性化したアラタ体が休眠を支配していると仮定すると凍結による休眠の終止はアラタ体の凍結による不活性化が原因であると思われる。一般に生物細胞は活動状態において特に凍結障害を受けやすいことが知られているから、活性化したアラタ体が凍結により障害を受ける可能性は十分に根拠がある。

### 参 考 論 文

- 丹野 皓三 1962 ムネアカオオアリの耐凍性Ⅰ, 低温科学, 生物篇, 20, 25-34。
- 丹野 皓三 1963 アゲハ越冬蛹の耐凍性, 低温科学, 生物篇, 21, 41-53。
- ASAHINA, E. and TANNO, K. 1963 A remarkably rapid increase of frost resistance in fertilized egg cells of the sea urchin. *Exptl. Cell Res.*, 31, 223-225。
- 丹野 皓三 1964 越冬期のツヤハナバチに含まれる多量の糖類, 低温科学, 生物篇, 22, 51-57。
- 丹野 皓三・朝比奈英三 1964 ポプラハバチの耐凍性Ⅰ, 低温科学, 生物篇, 22, 59-70。
- ASAHINA, E. and TANNO, K. 1964 A large amount of trehalose in a frost-resistant insect. *Nature*, 204, 1222。
- 丹野 皓三 1965 ポプラハバチの脂肪細胞, 低温科学, 生物篇, 23, 38-45。
- 丹野 皓三 1965 ポプラハバチの耐凍性Ⅱ, 低温科学, 生物篇, 23, 47-53。
- 丹野 皓三 1965 ポプラハバチの耐凍性Ⅲ, 低温科学, 生物篇, 23, 56-64。
- 朝比奈英三・丹野 皓三 1965 セクロピア蚕休眠蛹の耐凍性Ⅰ, 低温科学, 生物篇, 23, 71-76。
- 丹野 皓三・和田 実男 1966 潮間帯動物の耐凍性と冬期の生態, 低温科学, 生物篇, 24, 15-23。
- 朝比奈英三・丹野 皓三 1966 セクロピア蚕休眠蛹の耐凍性Ⅱ, 低温科学, 生物篇, 24, 25-34。
- TANNO, K. 1967 Freezing injury in fat-body cells of the poplar sawfly. In *Cellular injury and resistance in freezing organisms* (É. Asahina ed.), *Inst. Low Temp. Sci.*, Sapporo, 245-257。
- 丹野 皓三 1967 ポプラハバチ前蛹の凍結による休眠の終止, 低温科学, 生物篇, 25, 97-103。
- 朝比奈英三・丹野 皓三 1967 アワノメイガ幼虫の凍りかた, 低温科学, 生物篇, 25, 105-111。
- 丹野 皓三 1968 ポプラハバチの耐凍性Ⅳ, 低温科学, 生物篇, 26, 71-78。
- 丹野 皓三 1968 ポプラハバチの耐凍性Ⅴ, 低温科学, 生物篇, 26, 79-84。
- 根井外喜男・丹野 皓三 1968 氷点に近い温度での凍結による溶血の機構Ⅱ, 低温科学, 生物篇, 26, 91-97。
- 丹野 皓三 1970 昆虫の耐凍性と脂肪細胞。凍結乾燥と細胞障害, 根井外喜男編, 105-117。

## 論文審査結果の要旨

本論文はポプラハバチの凍結ならびに耐凍性を広く調べたものである。ポプラハバチは初秋に枯草の茎の中にマユを作り、その中で前蛹態で越冬する。したがって北国では冬期間 $-10^{\circ}\text{C}$ 以下の低温にさらされることは普通である。

ポプラハバチはマユに入り前蛹となると急に耐凍性は高まり、40日後には  $\text{liq. N}_2$  の温度にも耐え得るようになる。この耐凍性の変化に平行して体内では糖が増減する。最高  $40\text{mg/g W. W.}$  になり、翌春耐凍性の低下につれて再び減少する。耐凍性の高い時期では糖の90%以上がトレハロースであるが、低い時期には20~68%で、残りは主にグルコースである。つまり耐凍性の強さとトレハロースの量との間には平行関係がある。この耐凍性の強さと糖量との関係は植物では既によく知られているが、昆虫では初めての例である。

昆虫個体の凍害を見ると融解直後には障害を受けないように見えても、変態がすゝむにつれて種々の程度に害が現われる例が多い。そこで変態のさい重要な働きをする器官で脂肪体の凍害に注目して実験をすゝめた。前蛹体を急速に凍結し脂肪体の大部分の細胞が細胞内凍結を起こしても、融解直後前蛹は死なないが、蛹化はできない。種々の冷却速度で種々の程度に脂肪体を凍結させると、細胞内凍結をする脂肪細胞の割合が大きくなるにつれて、その後の発生段階に現われる障害は大きくなる。極端の場合は蛹化不能、次いで羽化不能、軽いときには羽化しても不完全なものになる。これら一連の実験で変態の進行は脂肪体の凍害の程度に著しく左右されることを明らかにした。個体単位の凍害とある特定の器官の凍害との連関を初めて具体的に明らかにした点は高く評価される。

この他超低温( $\text{liq. N}_2$ )にさらす場合の予備凍結効果についても一連の実験で新しい事実を見出し、さらに休眠が凍結により容易に破れることも確めている。

以上丹野皓三の研究は昆虫個体の耐凍性の解明に重要な手がかりとなる、いくつかの新事実を提呈するものであり、今後の凍害の研究に資するところは大きいと考える。

よって丹野皓三提出の論文は理学博士の学位論文として合格と認める。